

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003052

International filing date: 24 February 2005 (24.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-055086
Filing date: 27 February 2004 (27.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 02 June 2005 (02.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

28.02.2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 2 月 2 7 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 5 5 0 8 6
Application Number:

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

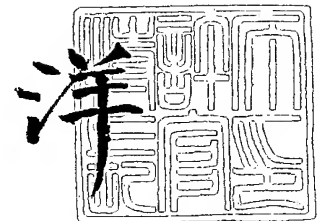
J P 2 0 0 4 - 0 5 5 0 8 6

出 願 人 独立行政法人科学技術振興機構
Applicant(s):

2 0 0 5 年 5 月 1 9 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 5 - 3 0 4 3 3 5 0

【書類名】 特許願
【整理番号】 N081P13
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C07H 21/00
【発明者】
 【住所又は居所】 埼玉県川口市西川口 2-11-21-701
 【氏名】 浅沼 浩之
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都渋谷区恵比寿南 3-11-17-308
 【氏名】 小宮山 真
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都文京区小日向 2-3-7 台町コーポ 101
 【氏名】 松永 大次郎
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都練馬区富士見台 4-36-40
 【氏名】 倉持 壮
【特許出願人】
 【識別番号】 503360115
 【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代理人】
 【識別番号】 100096714
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 本多 一郎
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 026516
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1

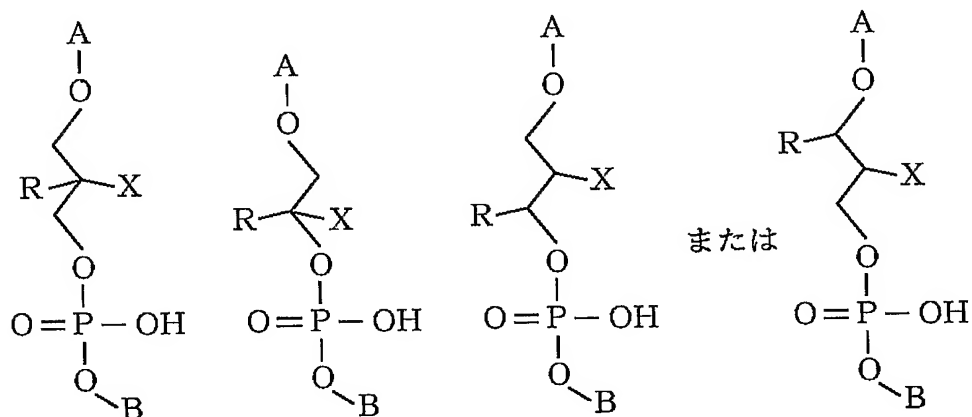
【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

DNA エンザイムの触媒活性ループの 3' 側の端に、アゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基が結合されたヌクレオチド残基が導入されていることを特徴とする DNA エンザイム。

【請求項 2】

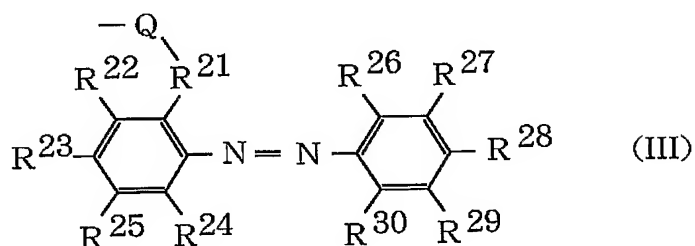
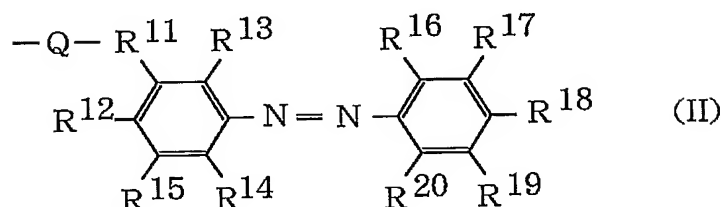
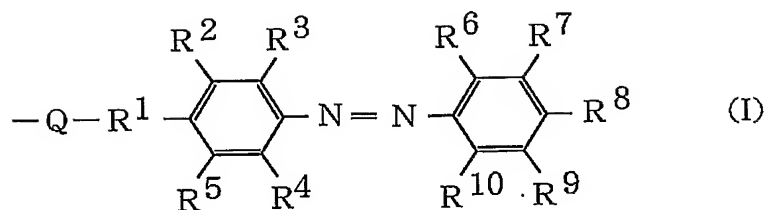
次式、



(上記式中、Aは触媒活性ループ端を表し、Bはヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを表し、Xはアゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基を表し、Rは水素原子または炭素原子数1～4の直鎖アルキル基を表す) で表される請求項1記載のDNAエンザイム。

【請求項 3】

前記Xが次式 (I)、(II) または (III)、



(上記式中、 R^1 、 R^{11} 、 R^{21} は夫々直接の結合；未置換もしくはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシ基で置換された炭素原子数1～20のアルキレン基、または未置換もしくはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシ基で置換された炭素原子数2～20のアルケニレン基であり、Qは直接の結合、酸素原子、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{CO}-$ 基または $-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-\text{NH}-$ 基、但し $n=1\sim5$ であり、 $\text{R}^2\sim\text{R}^{10}$ 、 $\text{R}^{12}\sim\text{R}^{20}$ 、 $\text{R}^{22}\sim\text{R}^{30}$ は夫々独立に、未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシ基で置換された炭素原子数1～20のアルキル基もしくはアルコキシ基；未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシ基で置換された炭素原子数2～20のアルケニル基もしくはアルキニル基；水酸基；ハロゲン原子；アミノ基；ニトロ基；またはカルボキシ基を表す)で表される請求項2記載のDNAエンザイム。

【請求項4】

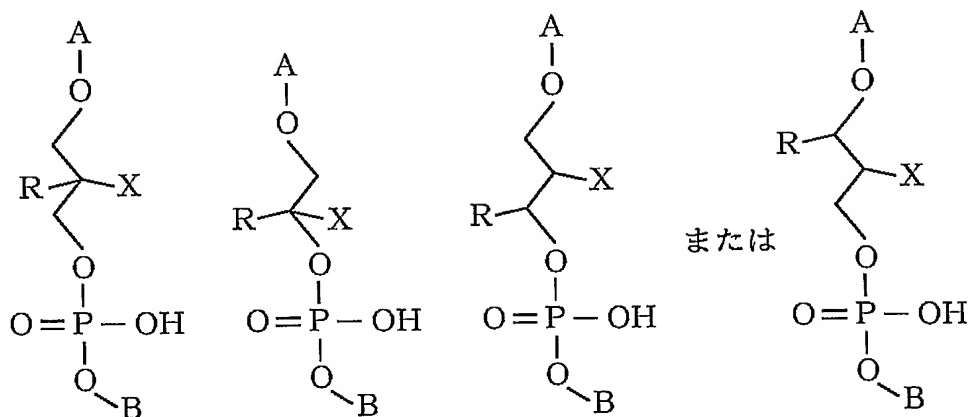
DNAエンザイムのRNA切断活性を制御するにあたり、アゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基が結合されたヌクレオチド残基が導入されているDNAエンザイムに対し、特定波長の光を照射することにより該有機基を平面構造と非平面構造とに可逆的に構造異性化させることを特徴とするDNAエンザイムの活性制御方法。

【請求項5】

前記ヌクレオチド残基の導入位置が触媒活性ループの3'側の端である請求項4記載のDNAエンザイムの活性制御方法。

【請求項6】

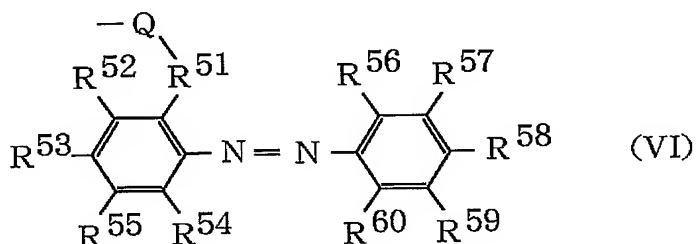
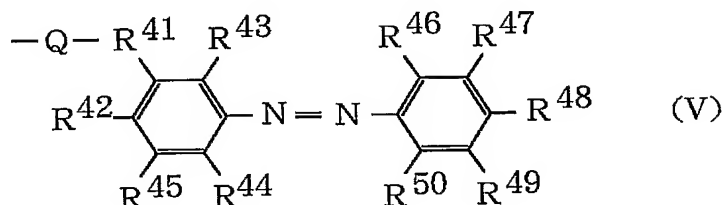
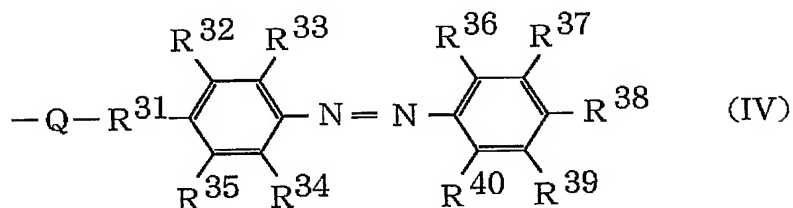
次式、



(上記式中、Aは触媒活性ループ端を表し、Bはヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを表し、Xはアゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基を表し、Rは水素原子または炭素原子数1～4の直鎖アルキル基を表す) で表される請求項5記載のDNAエンザイムの活性制御方法。

【請求項7】

前記Xが次式 (IV)、(V) または (VI)、



(上記式中、 R^{31} 、 R^{41} 、 R^{51} は夫々直接の結合；未置換もしくはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数1～20のアルキレン基、または未置換もしくはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数2～20のアルケニレン基であり、Qは直接の結合、酸素原子、-

(CH₂)_n-NH-CO-基または-(CH₂)_n-CO-NH-基、但し n=1~5 であり、R³²~R³⁷、R³⁹、R⁴⁰、R⁴²~R⁴⁷、R⁴⁹、R⁵⁰、R⁵²~R⁵⁷、R⁵⁹、R⁶⁰は夫々独立に、未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシ基で置換された炭素原子数 1~20 のアルキル基もしくはアルコキシ基；未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシ基で置換された炭素原子数 2~20 のアルケニル基もしくはアルキニル基；水酸基；ハロゲン原子；アミノ基；ニトロ基；またはカルボキシ基であり、R³⁸、R⁴⁸、R⁵⁸は、夫々独立に、未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシ基で置換された炭素原子数 1~20 のアルキル基もしくはアルコキシ基；未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシ基で置換された炭素原子数 2~20 のアルケニル基もしくはアルキニル基；水酸基；またはハロゲン原子を表す) で表される請求項 6 記載の DNA エンザイムの活性制御方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】DNAエンザイムおよびその活性制御方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、DNAエンザイムおよびその活性制御方法に関し、詳しくは、天然の4つの塩基のみで構成されるDNAエンザイムよりRNA切断活性を大幅に向上させたDNAエンザイム、および、特定波長の光照射によるDNAエンザイムの活性制御方法に関する。

【背景技術】

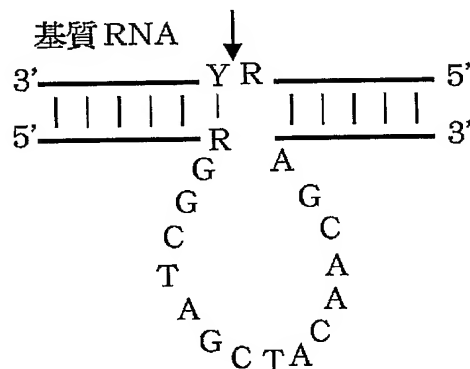
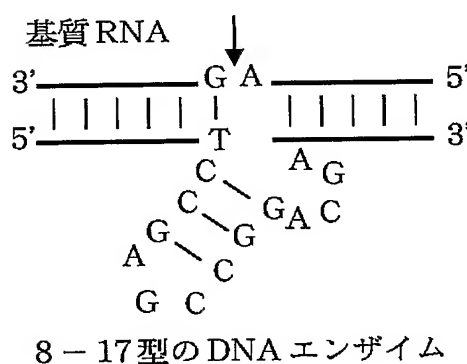
【0002】

RNAを配列選択的に加水分解することが可能となれば、メッセンジャーRNAのレベルでの遺伝子発現を抑制することが可能となり、遺伝子に基づく疾病の治療への応用が期待できる。天然に存在するRNA分解酵素はたんぱく質ではなく、RNAのみから構成されており、リボザイムと呼ばれている。しかしRNAは不安定で分解されやすいため、より安定なDNA加水分解酵素（人工酵素）が求められていた。その要請に対し、1997年にアメリカのJoyceらによって世界で初めて天然のDNAのみから構成されるRNA加水分解酵素が提案された（非特許文献1）。

【0003】

DNAのみから構成されるRNA加水分解酵素は一般的にDNAエンザイム（デオキシリボザイム、DNAザイム）と称され、*in vitro* selection法により開発された人工リボヌクレアーゼであり、生体内金属である Mg^{2+} をコファクターとすることから*in vivo*での応用が可能である。その具体的内容は非特許文献1に開示され、8-17型のDNAエンザイムと10-23型のDNAエンザイムがあり、その配列式は以下のようにになっている。

【0004】



【0005】

上記配列式中の矢印は切断部位を示す。切断部位における基質RNAの塩基配列は、8-17型のDNAエンザイムの場合はGAとなり、10-23型のDNAエンザイムの場合はY（UまたはC）R（AまたはG）となる。DNAエンザイムの配列は基質RNAと相補的な配列となる。ただし、8-17型のDNAエンザイムにおけるCCGAGCCG GACGAや10-23型のDNAエンザイムにおけるGGCTAGCTACAACGAは触媒活性ループであり、基質RNAと相補的ではない。

【0006】

一方、光照射による遺伝子発現制御に関しては、非特許文献2に報告されており、その遺伝子発現制御は、アゾベンゼンをDNAの側鎖に導入した人工DNAを用いることにより行われる。具体的には、アゾベンゼンは特定波長の光照射によりトランス体（平面構造

）とシス体（非平面構造）とに可逆的に構造異性化されるため、このアゾベンゼンの特性を利用することにより、DNAの二重鎖の形成と解離の光制御、三重鎖形成の光制御等を行うことが可能となる。

【非特許文献1】Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94.4262-4266(1997)

【非特許文献2】Journal of Japanese Society for Biomaterials 21.290-296(2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

非特許文献1に示されるDNAエンザイムはRNA切断活性そのものは決して高くなく、天然のリボザイムと比較すると活性は非常に低いものである。そこでDNAエンザイムの高活性化が望まれている。

【0008】

また、DNAエンザイムのRNA切断活性を制御することは極めて困難とされており、反応系内の条件を変化させることなく、外部刺激、例えば、光照射により、可逆的に活性制御することができれば、その有用性は大幅に向上し得るものである。

【0009】

そこで、本発明の目的は、これまでのDNAエンザイムに比し大幅にRNA切断活性を向上させたDNAエンザイムを提供することにある。

【0010】

また、本発明の他の目的は、光照射により可逆的にDNAエンザイムのRNA切断活性を制御することができる活性制御方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、DNAエンザイムの所定の部位に平面構造を有するヌクレオチド残基を導入することにより、上記目的を達成し得ることを見出し、本発明のDNAエンザイムを完成するに至った。

【0012】

即ち、本発明のDNAエンザイムは、DNAエンザイムの触媒活性ループの3'側の端に、アゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基が結合されたヌクレオチド残基が導入されていることを特徴とするものである。

【0013】

また、本発明者らは、上記DNAエンザイムに特定波長の光を照射することで上記平面構造を非平面構造に可逆的に構造異性化させることができ、これによりDNAエンザイムのRNA切断活性を制御することができ、上記他の目的を達成し得ることを見出し、本発明の活性制御方法を完成するに至った。

【0014】

即ち、本発明の活性制御方法は、DNAエンザイムのRNA切断活性を制御するにあたり、アゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基が結合されたヌクレオチド残基が導入されているDNAエンザイムに対し、特定波長の光を照射することにより該有機基を平面構造と非平面構造とに可逆的に構造異性化させることを特徴とするものである。

【発明の効果】

【0015】

平面構造を有するヌクレオチド残基が導入された本発明のDNAエンザイムは、天然の4つの塩基のみで構成されるDNAエンザイムと比較し、RNA切断活性が大幅に向上する。また、本発明のDNAエンザイムの活性制御方法によれば、特定波長の光の照射により可逆的にDNAエンザイムの切断活性を制御することが可能となり、*in vivo*で

の遺伝子発現の光制御が期待できる。

【発明を実施するための最良の形態】

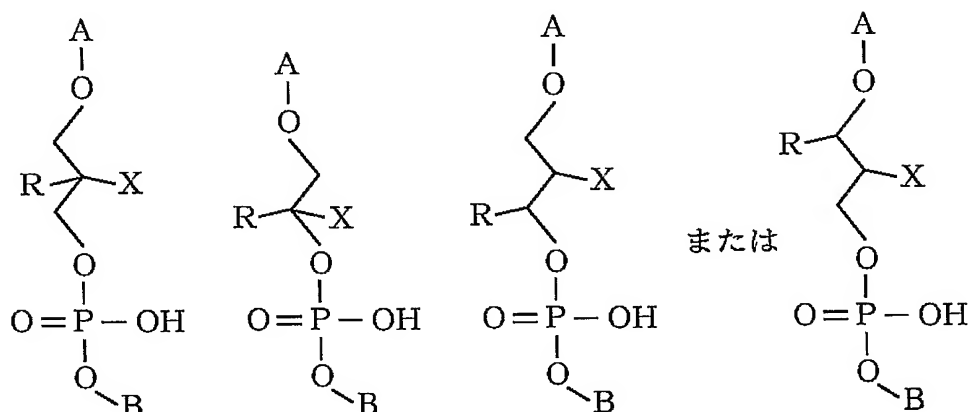
【0016】

以下、本発明の実施の形態を具体的に説明する。

本発明のDNAエンザイムは、前記非特許文献1記載のDNAエンザイムの触媒活性ループの3'側の端に、平面構造を有するアゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基が結合されたヌクレオチド残基が導入され、化学修飾されたものである。かかるDNAエンザイムの塩基配列は触媒活性ループを除き、基質RNAと相補的な塩基である。ただし、RNAの塩基配列は、特に制限されるものではない。

【0017】

本発明のDNAエンザイムは、例えば、次式で表される。

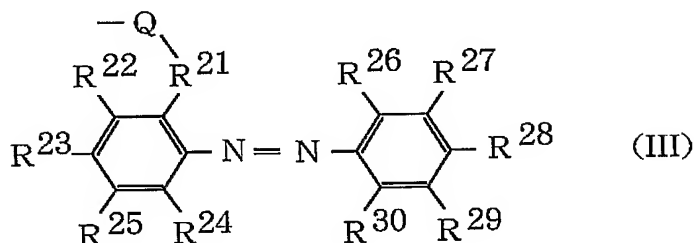
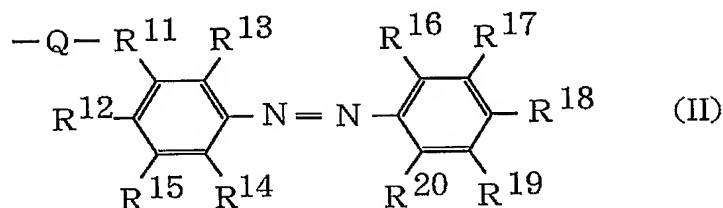
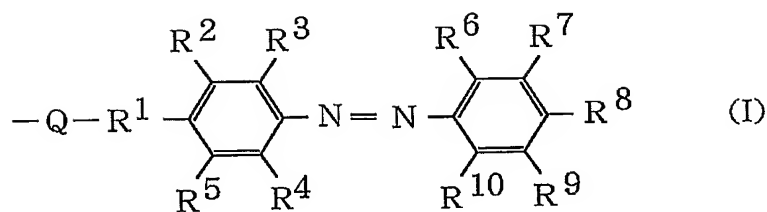


【0018】

上記式中、Aは触媒活性ループ端を表し、Bはヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを表す。また、Xはアゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基を表す。Rは未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシ基で置換された炭素原子数1～20、好ましくは1～10、より好ましくは1～4のアルキル基もしくはアルコキシ基；未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシ基で置換された炭素原子数2～20、好ましくは2～10、より好ましくは2～4のアルケニル基もしくはアルキニル基；水酸基；ハロゲン原子；アミノ基；ニトロ基；またはカルボキシ基を表す。

【0019】

前記Xは、好ましくは、アゾベンゼンまたはその誘導体である。また、ヌクレオチド残基との結合部にいかなる介在基を有していてもよい。Xとしては、例えば、次式(I)、(II)または(III)で表される有機基を挙げることができる。



【0020】

上記式 (I)、(II) および (III) 中、 R^1 、 R^{11} 、 R^{21} は夫々直接の結合；未置換もしくはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシ基で置換された炭素原子数 1～20、好ましくは 1～10、更に好ましくは 1～4 のアルキレン基、または未置換もしくはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシ基で置換された炭素原子数 2～20、好ましくは 2～10、更に好ましくは 2～4 のアルケニレン基である。Q は、直接の結合、酸素原子、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{CO}-$ 基または $-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-\text{NH}-$ 基、但し $n=1\sim 5$ である。 $\text{R}^2\sim\text{R}^{10}$ 、 $\text{R}^{12}\sim\text{R}^{20}$ 、 $\text{R}^{22}\sim$ 、 R^{30} は夫々独立に、未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシ基で置換された炭素原子数 1～20、好ましくは 1～10、更に好ましくは 1～4 のアルキル基もしくはアルコキシ基；未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシ基で置換された炭素原子数 2～20、好ましくは 2～10、更に好ましくは 2～4 のアルケニル基もしくはアルキニル基；水酸基；ハロゲン原子；アミノ基；ニトロ基；またはカルボキシ基を表す。

【0021】

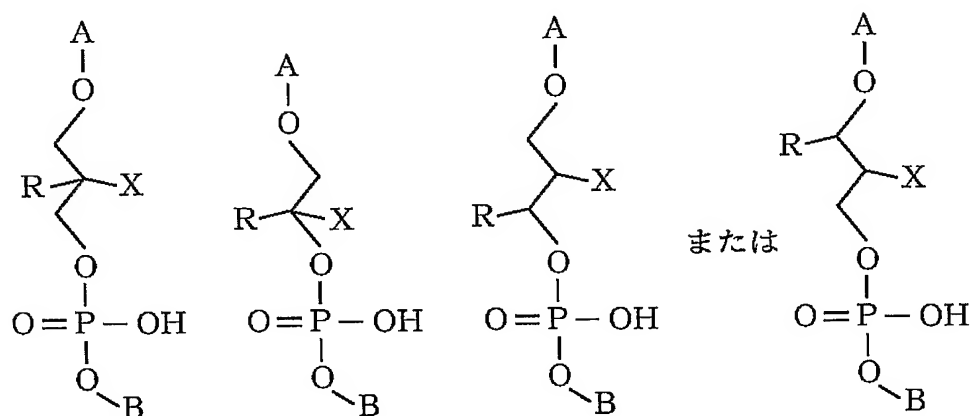
本発明に係るヌクレチド残基の導入された DNA エンザイムの合成は、既知の手法、例えば、The Journal of Organic Chemistry 62.846-852(1997)、Tetrahedron Letters 39.9019-9022(1998) および Angewandte Chemie International edition 40.2671-2673(2001) に記載の手法に従い、行うことができる。夫々のヌクレチド残基に対応するホスホアミダイトモノマーを合成し、既存の DNA 合成機を使用することにより、所望のヌクレチド残基を導入した DNA エンザイムを合成することができる。この場合、ポリメチレン鎖は様々な長さのものを用いることができるが、未置換またはアルキル基で置換されたエチレン鎖またはトリメチレン鎖が好ましい。また、この場合、導入すべき有機基は、エチレン鎖の場合にはいずれかの炭素原子に、トリメチレン鎖の場合には中央の炭素原子に共有結合的に導入するのが好ましい。

【0022】

次に、DNAエンザイムのRNA切断活性を制御する方法について説明する。先ず、特定波長の光を照射することにより平面構造と非平面構造とに構造異性化するアゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基が結合されたヌクレオチド残基が導入されたDNAエンザイムを用い、これに特定波長の光を照射する。これにより平面構造と非平面構造とに可逆的に前記有機基を構造異性化させることができ、RNA切断活性が制御可能となる。ここで、DNAエンザイムの塩基配列は触媒活性ループを除き、基質RNAと相補的な塩基である。ただし、RNAの塩基配列は、特に制限されるものではない。

【0023】

また、前記ヌクレオチド残基の導入位置が触媒活性ループの3'側の端であれば本発明のDNAエンザイムとなり、高いRNA切断活性を示すことになるが、本発明の活性制御方法は前記導入位置は特に制限されるものではなく、基質RNAと相補的なオリゴヌクレオチド中であってもよい。かかるDNAエンザイムは、例えば、次式で表される。



【0024】

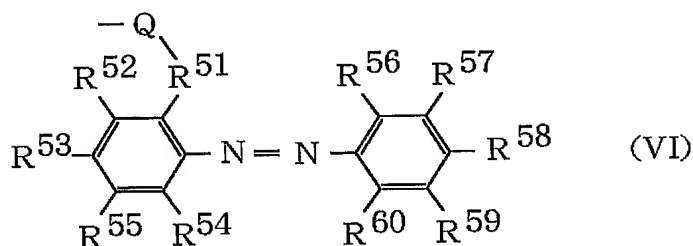
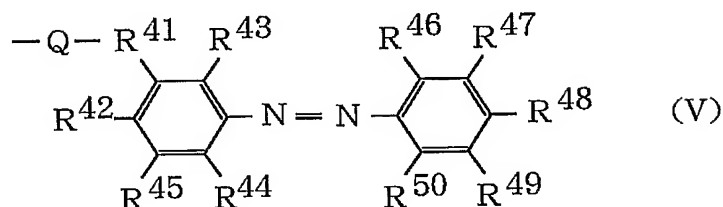
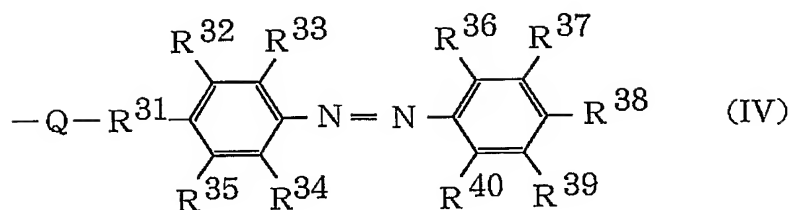
上記式中、AおよびBは水素原子、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを表す。但し、AおよびBが共に水素原子である場合はない。Xはアゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基を表す。Rは未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシ基で置換された炭素原子数1~20、好ましくは1~10、より好ましくは1~4のアルキル基もしくはアルコキシ基；未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシ基で置換された炭素原子数2~20、好ましくは2~10、より好ましくは2~4のアルケニル基もしくはアルキニル基；水酸基；ハロゲン原子；アミノ基；ニトロ基；またはカルボキシ基を表す。

【0025】

前記Xは、好ましくは、アゾベンゼンまたはその誘導体である。この場合、光照射による可逆的な構造異性化による酵素活性の制御機能を害しない限り、ベンゼン環にいかなる置換基を有していてもよく、また、ヌクレオチド残基との結合部にいかなる介在基を有していてもよいが、好ましくはアゾベンゼンのパラ位の置換基および介在基は、ベンゼン環と共鳴構造をとらない基とする。

【0026】

パラ位におけるカルボキシ基、アミノ基、ニトロ基のような置換基およびパラ位におけるアミド結合は、パラ位に共鳴構造をとるため、アゾベンゼンはシス体（非平面構造）とトランス体（平面構造）へ熱的に異性化しやすくなるためである。なお、メタ位の置換基はニトロ基以外の基であることが好ましい。Xとしては、例えば、次式（IV）、（V）または（VI）で表される有機基を挙げることができる。



【0027】

上記式 (IV)、(V) および (VI) 中、 R^{31} 、 R^{41} 、 R^{51} は夫々直接の結合；未置換もしくはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数 1～20、好ましくは 1～10、更に好ましくは 1～4 のアルキレン基、または未置換もしくはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数 2～20、好ましくは 2～10、更に好ましくは 2～4 のアルケニレン基である。Q は、直接の結合、酸素原子、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{CO}-$ 基または $-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-\text{NH}-$ 基、但し $n=1\sim 5$ である。 $\text{R}^{32}\sim\text{R}^{37}$ 、 R^{39} 、 R^{40} 、 $\text{R}^{42}\sim\text{R}^{47}$ 、 R^{49} 、 R^{50} 、 $\text{R}^{52}\sim\text{R}^{57}$ 、 R^{59} 、 R^{60} は夫々独立に、未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数 1～20、好ましくは 1～10、更に好ましくは 1～4 のアルキル基もしくはアルコキシ基；未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数 2～20、好ましくは 2～10、更に好ましくは 2～4 のアルケニル基もしくはアルキニル基；水酸基；ハロゲン原子；アミノ基；ニトロ基；またはカルボキシル基を表す。また、 R^{38} 、 R^{48} 、 R^{58} は、夫々独立に、未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数 1～20、好ましくは 1～10、更に好ましくは 1～4 のアルキル基もしくはアルコキシ基；未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数 2～20、好ましくは 2～10、更に好ましくは 2～4 のアルケニル基もしくはアルキニル基；水酸基；またはハロゲン原子を表す。また、好ましくは、式 (IV) 中において $-\text{Q}-\text{R}^{31}-$ はアゾベンゼンと共鳴構造をとらない介在基である。

【0028】

前記有機基を構造異性化させるために照射する光は、該有機基の異性化が可能ならば紫外領域から赤外領域までのすべての波長の光を用いることができるが、DNA を損傷させない 300 nm 以上が好ましい。例えば、300～400 nm の光 (UV 光) を照射する

ことにより、一の異性体から他の異性体に構造異性化し、400 nm以上の光（可視光）を照射することにより、その逆の変化を起こすことができる。

【実施例】

【0029】

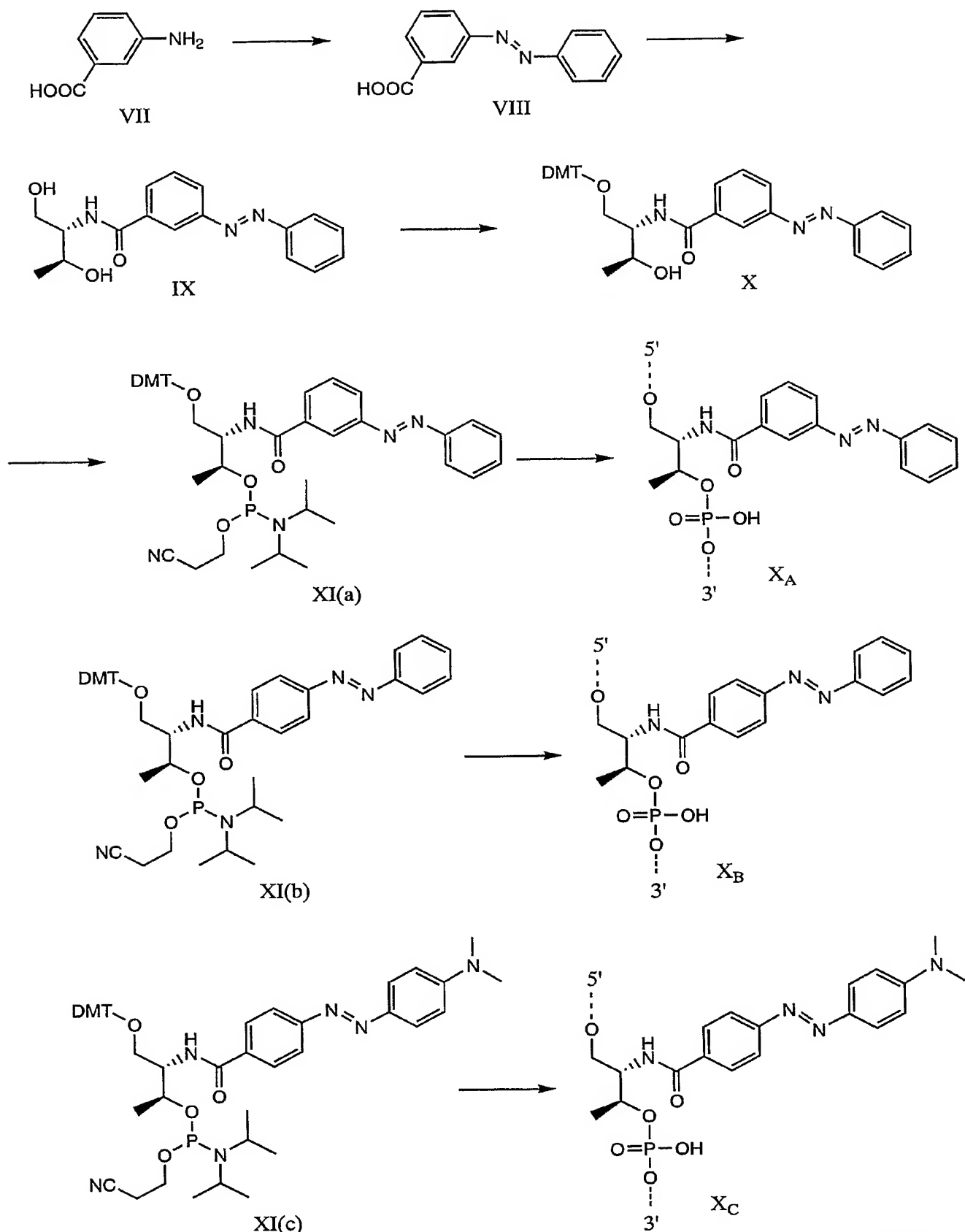
以下に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明をするが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0030】

合成例 1

「アゾベンゼン誘導体導入DNAエンザイムの合成」

以下のスキームにて合成を行った。



まず、3-アミノ安息香酸VIIを酢酸に溶解させ、これにニトロソベンゼンの酢酸溶液を混合し、12時間室温で攪拌することで、3-フェニルアゾ安息香酸VIIIの粗生成物を得た。次に、得られた粗生成物をエタノールを用い、再結晶を行うことにより精製した。得られた3-フェニルアゾ安息香酸VIIIとD-トレオニノールをN,N-ジメ

チルホルムアミド (DMF) 中で、ジシクロヘキシルカルボジイミドと1-ヒドロキシベンゾトリアゾールの存在下にて反応させることにより3-フェニルアゾ安息香酸V I I IとD-トレオニノールとがアミド結合によって結合された化合物I Xの粗生成物を得た。

【0031】

次に、得られた化合物I Xをカラムクロマトグラフ法で分離精製した後、Angewandte Chemie International edition 40.2671-2673(2001)記載の手法に従い、ピリジン・ジクロロメタン混合溶媒中で4-ジメチルアミノピリジンの存在下にて4, 4'-ジメトキシトリチルクロリドを反応させることにより、4, 4'-ジメトキシトリチル (DMT) 基で一方の水酸基を保護した化合物Xの粗生成物を得た。得られた化合物Xをカラムクロマトグラフ法で分離精製した。次に、The Journal of Organic Chemistry 62.846-852(1997)、Tetrahedron Letters 39.9019-9022(1998)記載の手法に従い、得られた化合物Xと2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイトをアセトニトリル中で、1H-テトラゾール存在下にて反応させることにより、もう一方の水酸基にホスホロアミジドが付加したホスホアミダイトモノマーX I (a)の粗生成物を得た後、カラムクロマトグラフ法で分離精製した。

【0032】

また、3-フェニルアゾ安息香酸V I I Iの代わりに4-フェニルアゾ安息香酸を用いる以外は上記と全く同様の方法によって、ホスホロアミダイトモノマーX I (b)を合成した。更に、3-フェニルアゾ安息香酸V I I Iの代わりにパラ-メチルレッドを用いる以外は上記と全く同様の方法によってホスホロアミダイトモノマーX I (c)を合成した。

【0033】

最後に、本発明であるアゾベンゼン誘導体を導入した化学修飾DNAエンザイムの合成を行った。本実施例では、10-23型のDNAエンザイムを合成した。化学修飾DNAエンザイムの合成はA B I 3 9 4型DNA合成機を使用し、上記の得られたホスホアミダイトモノマーX I (a) ~ (c)と4つの天然の塩基に対応する市販のホスホアミダイトモノマーを用い、下記の塩基配列を持つ本発明のDNAエンザイム (DNA-1A、DNA-1B、DNA-1C)を合成した。通常のプロトコルに従い、粗生成物を得た後、その粗生成物をゲル精製、高速液体クロマトグラフィー精製を行い精製した。また、比較例として、天然の4つの塩基のみで構成されるDNAエンザイム (DNA-N)も、上記と同様の手法で合成した。夫々の塩基配列を下記の表1に示す。塩基配列中、下線部の引かれた塩基配列は触媒活性ループを表す。

【0034】

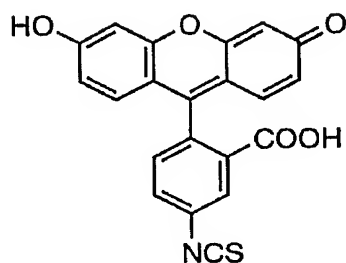
【表1】

DNA エンザイム	塩基配列
DNA-N	5' - CTGAAGGGGGCTAGCTACAACGATTCTTCCT - 3'
DNA-1A	5' - CTGAAGGGGGCTAGCTACAACGAX _A TTCTTCCT - 3'
DNA-1B	5' - CTGAAGGGGGCTAGCTACAACGAX _B TTCTTCCT - 3'
DNA-1C	5' - CTGAAGGGGGCTAGCTACAACGAX _C TTCTTCCT - 3'

【0035】

全てのDNAエンザイムはMALDI-TOFMSにより同定した。また、基質として

用いたRNAの配列は以下の通りである。基質RNAを蛍光ラベルするために、5'末端に次式、



で表されるフルオレセインイソチオシアナート (FITC) を導入した。
5' - (FITC) - AGGAAGAAGCCCUUCAG - 3'

【0036】

実施例1～3、比較例1

「RNA切断実験」

合成例1にて合成したDNAエンザイム (DNA-N、DNA-1A、DNA-1B、DNA-1C) を用いて、以下の手順に従ってRNA切断実験を行った。まず、DNAエンザイムの水溶液を4 μ L、基質RNAの水溶液4 μ L、更にバッファー水溶液4 μ Lをマイクロチューブに採取し、室温で十分に攪拌・混合した。反応液中に含まれる各物質の最終濃度は以下の通りとなるように調製した。

DNAエンザイム: 16 μ mol/L

基質RNA: 1.6 μ mol/L

Tris-HCl: 50mmol/L

塩化マグネシウム: 10mmol/L

塩化ナトリウム: 1mol/L

【0037】

次に、得られた反応溶液を37℃に調整した恒温槽に移し、比較例1 (DNA-N) および実施例1～2 (DNA-1A、DNA-1B) は1時間、実施例3 (DNA-1C) は40分間、反応させた。その後、尿素10mol/Lとエチレンジアミン四酢酸50mmol/Lを含む水溶液を12 μ L加えて反応を停止させ、アクリルアミドゲル電気泳動法によりRNAの切断断片と未切断のRNAを分離した。最後に、このゲルをフルオロイメージャー (FLA-3000: 富士写真フイルム社製) を用いて470nmの光でFITCを励起し、520nmの蛍光強度をモニターすることで、RNAの切断量を定量化した。その切断結果を下記の表2に示す。

【0038】

【表2】

	DNA エンザイム	切断量 (%)
比較例1	DNA - N	12.5
実施例1	DNA - 1A	38.8
実施例2	DNA - 1B	36.0
実施例3	DNA - 1C	33.3

【0039】

表2に示す結果より、DNAエンザイムの触媒活性ループの3'側の端に平面性の高い分子を化学的に導入することで、天然の塩基のみから形成される従来のDNAエンザイム

より、高いRNA切断活性を有することが確認された。また、メターアゾ（実施例1）、パラアゾ（実施例2）、メチルレッド（実施例3）の三者とも同程度のRNA切断活性を有することことから、平面状物質であれば、インターカレートして安定化させることができると考えられる。

【0040】

実施例4～7、比較例2

「RNA切断活性の光制御」

合成例1の方法に準拠して、DNAエンザイムを追加合成した。その塩基配列を下記の表3に示す。塩基配列中、下線の引かれた塩基配列は触媒活性ループを表す。

【0041】

【表3】

DNA エンザイム	塩基配列
DNA-2A	5' - CTGAAGGGGGCTAGCTACAACGATX _A TCTTCCT - 3'
DNA-3A	5' - CTGAAGGGGGCTAGCTACAACGATTGX _A TTCCT - 3'

【0042】

得られたDNAエンザイムを用い、実施例1～3と全く同様の手順に従い、室温で反応溶液を調製した。次に、これを37℃の恒温槽に移し、UV-A蛍光ランプ（FL6BL-A：東芝製）を用いてUV-D36Cフィルター（朝日テクノグラス製）を通した紫外光を照射しながら所定の時間反応させた。この条件下でのUV光の強度は、 $100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ 以下であった。また、同じ組成の反応溶液を、UV光を照射しない事以外は全く同じ条件で反応させた。その後、実施例1～3と同様に尿素-EDTA溶液を加えて反応を停止させ、アクリルアミドゲル電気泳動法によりRNAの切断断片と未切断のRNAを分離した。最後に、このゲルをフルオロイメジャー（FLA-3000：富士写真フイルム社製）を用いて470nmの光でFITCを励起し、520nmの蛍光強度をモニターすることで、RNAの切断量を定量化した。その切断結果を下記の表4に示す。

【0043】

【表4】

	DNA エンザイム	切断量 (%)		反応時間
		UV光照射下	UV光未照射	
比較例2	DNA-N	37.3	37.6	4時間
実施例4	DNA-1A	12.4	38.8	1時間
実施例5	DNA-1B	21.7	39.0	1時間
実施例6	DNA-2A	18.0	29.4	4時間
実施例7	DNA-3A	12.3	18.5	4時間

【0044】

表4に示す結果より、特定波長の光の照射により平面構造と非平面構造とに構造異性化する有機基が結合された残基が触媒活性ループの3'側の端または基質RNAと相補的なオリゴヌクレオチド中に導入されたDNAエンザイムに対し、特定波長の光を照射することにより該有機基を平面構造と非平面構造とに可逆的に構造異性化させることで、RNA

切断活性を制御できることが確認された。また、平面構造と非平面構造とに構造異性化する有機基が結合されたヌクレオチド残基を触媒活性ループの3'側の端および基質RNAと相補的なオリゴヌクレオチド中の両方に導入されたDNAエンザイムにおいても、光照射によりRNA切断活性を制御することができると考えられる。

【産業上の利用可能性】

【0045】

本発明の高活性DNAエンザイムを使用することで、従来と比較し、メッセンジャーRNAのレベルでの遺伝子発現の抑制を効率的に行うことが可能となる。また、光照射によりDNAエンザイムの酵素活性を制御することができることにより、遺伝子発現を可逆的に制御することが可能となる。これにより、バイオテクノロジーの種々の分野において、その有用性が期待できる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 これまでのDNAエンザイムに比し大幅にRNA切断活性を向上させたDNAエンザイム、および、光照射により可逆的にDNAエンザイムのRNA切断活性を制御することができる活性制御方法を提供する。

【解決手段】 DNAエンザイムの触媒活性ループの3'側の端に、アゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基が結合されたヌクレオチド残基が導入されているDNAエンザイム、およびDNAエンザイムのRNA切断活性を制御するにあたり、アゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基が結合されたヌクレオチド残基が導入されているDNAエンザイムに対し、特定波長の光を照射することにより該有機基を平面構造と非平面構造とに可逆的に構造異性化させることによる活性制御方法である。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 0 5 5 0 8 6
受付番号	5 0 4 0 0 3 2 6 7 4 6
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 6 年 3 月 1 日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成16年 2月27日

特願 2 0 0 4 - 0 5 5 0 8 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 3 6 0 1 1 5]

1. 変更年月日	2 0 0 3 年 1 0 月 1 日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
氏 名	独立行政法人 科学技術振興機構

2. 変更年月日	2 0 0 4 年 4 月 1 日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
氏 名	独立行政法人科学技術振興機構